

発生・成長時のマウス下顎骨関節頭軟骨における 25kDa熱ショック蛋白質 (Hsp25) の局在とその役割

金沢大学大学院医学系研究科がん医科学専攻細胞浸潤学
(旧講座名：歯科口腔外科学)
(主任：山本悦秀教授)

島 田 真 弓

下顎骨関節頭は、表面が薄い線維性被膜に覆われた軟骨で構成されており、その成長は深層の軟骨層が骨に置換される軟骨内骨化によって進行する。従って下顎頭軟骨は関節軟骨と骨端板軟骨の両方の性質を有していると考えられる。この成長が抑制されると顎変形症や顎関節症の原因となる。低分子量ファミリーに属する25kDaの熱ショック蛋白質 (25kDa Heat shock protein, Hsp25) は、発生における種々の細胞の増殖期と分化期の移行期に強く発現し、増殖から分化へのスイッチにおいて何らかの役割を果たすと考えられている。軟骨内骨化をする長管骨の骨端板軟骨においては、Hsp25は肥大軟骨細胞に特異的に発現し、軟骨細胞の分化に関わると報告されている。本研究では雄のddYマウスを用いて各発生段階の下顎頭軟骨におけるHsp25の局在を増殖細胞の指標である増殖細胞核抗原 (proliferative cell nuclear antigen, PCNA) の局在と比較しながら免疫組織化学的に調べ、さらに成長に伴う軟骨細胞の増殖活性の変化との関係や、成長に伴う食性の変化によって起こる顎関節への荷重負担の変化との関係についても検討した。下顎頭では胎生16日に軟骨細胞が分化し、胎生17日では肥大軟骨細胞にHsp25免疫活性が認められた。生後0日齢頃から関節腔、関節円板が形成され、さらに生後1週齢には軟骨層が明瞭になってきた。生後3週齢から、肥大軟骨層に加えてその上部の成熟層の軟骨細胞にもHsp25免疫活性が認められた。一方PCNAについては、生後3週齢までは増殖層および成熟層に免疫陽性の軟骨細胞が局在していたが、生後6週齢では増殖層だけに局在が限局した。すなわちHsp25陽性細胞とPCNA陽性細胞は相反することがわかった。生後3週齢はほぼ離乳期で、食性が母乳から固形飼料へ変化することによって下顎頭に対する荷重負担の変化する時期であることから、食飼が異なる飼育を行い、Hsp25とPCNAの局在の変化を比較した。マウスを生後3週齢から固形飼料で8週間飼育した場合、下顎頭の成熟層および肥大軟骨細胞層の軟骨細胞がHsp25免疫陽性を示したが、粉末飼料で飼育した場合では、肥大軟骨細胞層の軟骨細胞のみがHsp25免疫陽性を示し、陽性細胞率は固形飼料群と比べて有意 ($p < 0.05$) に減少した。形態的には下顎頭軟骨の厚さが有意に薄くなり、肥大軟骨細胞が小さくなった。一方PCNA陽性の軟骨細胞率は、粉末飼料を用いて生後3週齢から1週間飼育した場合、固形食群と比較して有意 ($p < 0.05$) に増加した。以上の結果から、下顎頭軟骨の発生と成長において、Hsp25は軟骨細胞の増殖から分化へのスイッチの促進に関わっており、かつ離乳期以降の食性の変化に伴う荷重ストレスの増加に対応してHsp25の発現・局在が変化し、下顎頭の成長を調整していると考えられる。

Key words Hsp25, mandibular condyle, development and growth, hypertrophic chondrocyte, soft foods

緒 言

下顎骨関節頭 (下顎頭) は下顎骨の上端に位置し、側頭骨下顎窩、関節円板、関節腔、関節包、下顎骨関節突起、外側翼突筋などとともに顎関節を構成している。下顎頭の表面に存在する軟骨の成長は顎顔面の成長・発達において重要な役割を果たすと考えられており、ことに下顎骨の成長ではその成長の速度や方向を決めていると言われている¹⁾²⁾。また下顎頭軟骨の成

長には適度な荷重ストレスが必要であると考えられている。従って左右の下顎頭での成長バランスの不均等や形成不全が生じることによって、顎変形症や顎関節症の原因となる³⁾。一方胎生期における発生では、下顎頭は膜性骨化により生じる下顎体とは別に軟骨内骨化により発生し、その後癒合して一体化し成長する。下顎頭軟骨は線維層、増殖層、成熟層、肥大軟骨層の4層からなり、生後も軟骨内骨化により下顎頭の成長に寄与する^{1)~3)}。

平成14年9月19日受付、平成14年11月14日受理

Abbreviations : Hsp, heat shock protein; PCNA, proliferative cell nuclear antigen; BSP, bone sialoprotein; EGF, epidermal growth factor; Ihh, Indian hedgehog; PTHrP, parathyroid hormone-related protein; BMP, bone-matrix protein; FGF, fibroblast growth factor; 下顎骨関節頭; 下顎頭

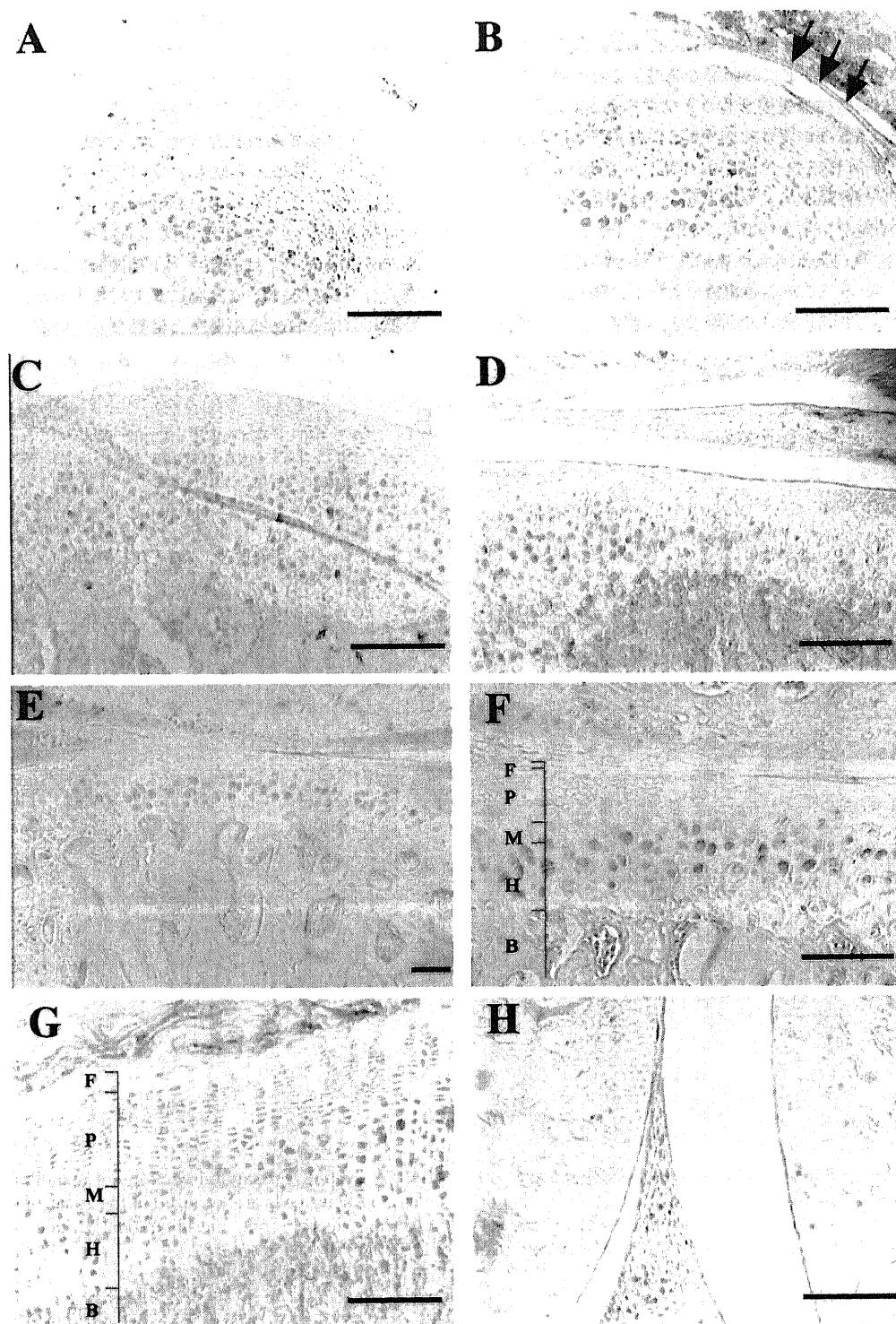


Fig. 1. Light micrographs showing immunohistochemistry with anti-Hsp25 antibody in sagittal sections of mandibular condyles (A-F) and of growth palates (G) and articular cartilages (H) of knee joint in adult rats. (A) Condylar cartilages of mandible at embryonic day 17 (E17). Many hypertrophic chondrocytes are immunopositive for Hsp25. (B) At postnatal day 0 (P0), many hypertrophic chondrocytes are immunopositive for Hsp25. The articular cavity and disc (arrows) are recognized. (C) At P1w, Hsp25-immunopositive chondrocytes are exclusively recognized in the zone of hypertrophy. (D) At P3w, Hsp25-immunopositive chondrocytes are localized in the zones of maturation and hypertrophy. (E, F) In adult, Hsp25-immunopositive chondrocytes are localized in the zones of maturation and hypertrophy. F, fibrous layer; P, zone of proliferation; M, zone of maturation; H, zone of hypertrophy; B, bone layer. Hsp25-immunopositive chondrocytes are exclusively localized in the zone of hypertrophy. (G) Growth plate of adult tibia undergoing endochondral ossification. (H) Articular cartilage of adult knee joint. No immunoreaction for Hsp25 is recognized. Scale bars indicate 50 μ m, (A-D, F-H) \times 20, (E) \times 4.

熱ショック蛋白質 (Heat shock protein, Hsp) は、熱や重金属、エタノールなどのストレス刺激によって誘導される蛋白質で、分子シャペロンとして変性蛋白に結合して凝集を防いで細胞死を抑制するが、生理的条件下においても発現して新生ポリペプチドの凝集抑制や細胞内輸送等を行うと考えられている^{4)~8)}。Hspはその分子量によって大きく2つあるいは3つに分類されているが、低分子量Hspファミリーに属する25kDaのHsp (Hsp25) は、生後発育期のラット顎下腺⁹⁾、胎生期マウスで心内膜床から弁や中隔が分化する段階の心臓¹⁰⁾、TおよびBリンパ球¹¹⁾、骨芽細胞¹²⁾、Ehrlich 腹水癌細胞¹³⁾ などに発現・局在すると報告されている。これらの組織において、Hsp25は従来から言われている抗アポトーシス作用の他、細胞分化の分子機

構に関わっている可能性が指摘されてきた¹⁴⁾。ES細胞を用いた最近の研究によって、増殖期と分化期の移行期にHsp25が一過性に強く発現することがわかり、増殖から分化へのスイッチに何らかの役割を果たすことが示唆された¹⁵⁾¹⁶⁾。軟骨組織においては、ラット長管骨を用いた研究によりHsp25は軟骨内骨化を行っている骨端板軟骨の肥大軟骨細胞に局在すると報告されている¹⁷⁾¹⁸⁾。Hsp25の肥大軟骨細胞における役割は未だはっきりとは分かっていないが、軟骨細胞のアポトーシスや石灰化開始に関するシグナル伝達に関わると推測されている。しかしNozawa-Inoueら³⁾は成熟ラット顎関節ではHsp25は関節軟骨の肥大層のみならず、成熟層にまで局在すると報告しており、膝関節におけるHsp25の局在とは異なっている。全ての関節は機

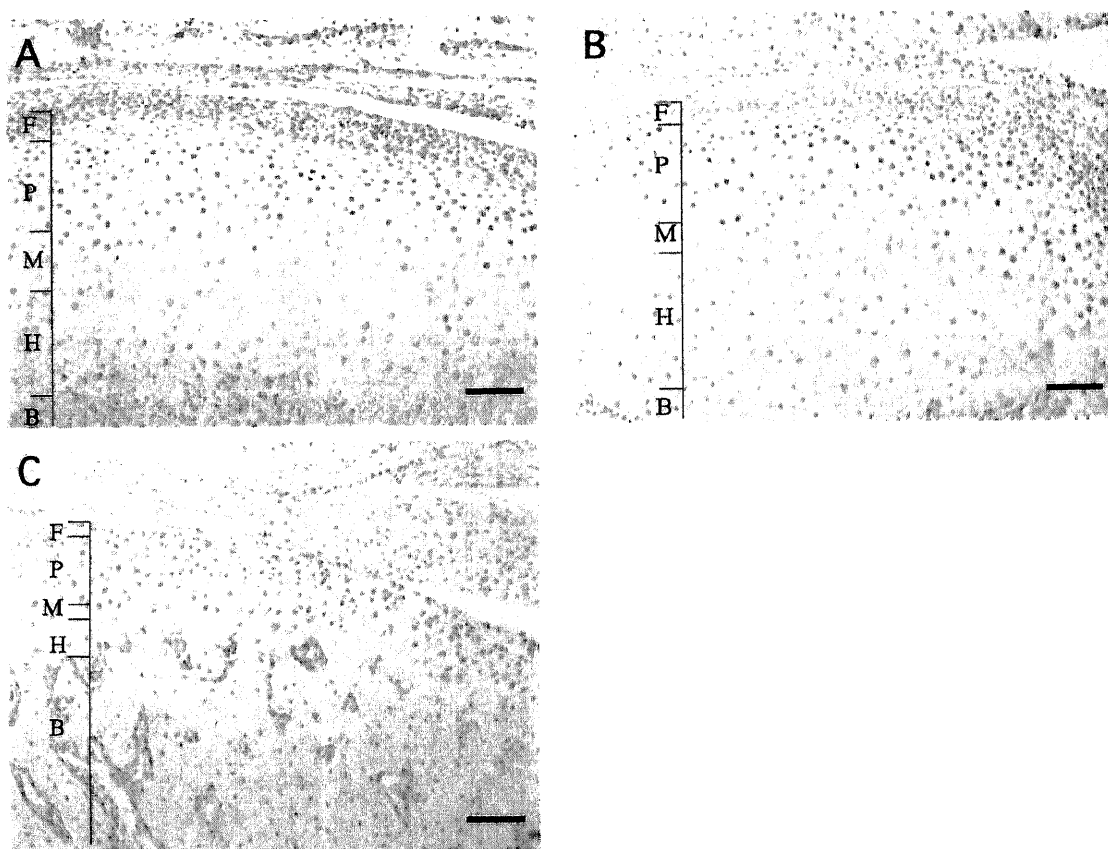


Fig. 2. Light micrographs showing immunohistochemistry with anti-PCNA antibody in sagittal sections of mandibular condyles in developing rats at P1.5w (A), P3w (B) and P6w (C). Note that PCNA-immunopositive cells are localized in the zones of proliferation and maturation at P1.5w and P3w, and in the zone of proliferation at P6w. F, fibrous layer; P, zone of proliferation; M, zone of maturation; H, zone of hypertrophy; B, bone layer. Scale bars indicate 50 μ m, (A-C) $\times 10$.

Table 1. Immunoreactivity for Hsp 25 and PCNA in the cartilaginous layer of the growing mandibular condyles

Layer	P10		P21		P42	
	Hsp25	PCNA	Hsp25	PCNA	Hsp25	PCNA
Proliferative layer	—	+++	—	+++	—	+
Mature layer	—	+++	+	++	+	—
Hypertrophic layer	++	—	++	—	++	—

+++ , all cells are immunoreactive; ++ , almost all cells are immunoreactive; + , some of the cells are immunoreactive ; — , negative.

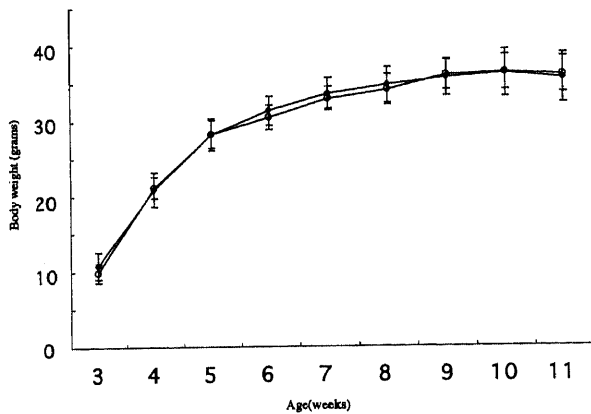


Fig. 3. Change in the body weight of mice fed with hard (○) or soft foods (◆) for 8 weeks starting from P3w. Each point represents \pm SD of 6-32 mice. There are no significant differences between the two groups.

能上大きな荷重ストレスがかかっており、その役割は体重の増加を伴う成長発育によって変化すると考えられる。ことに顎関節は既に述べたように成長に伴って食性が変化し、それによってかかる荷重の大きさや方向が変化することから、他の関節に比べて生後発育段階でより大きな変化があると思われる。

そこで本研究では、顎関節の下顎頭軟骨における Hsp25 の役割を明らかにするため、胎生期から生後の各発育段階のマウス下顎頭軟骨における Hsp25 の局在とその変化を免疫組織化学的に詳細に調べた。さらに下顎頭の成長に伴う軟骨細胞の増殖活性の変化との関係や、食性が変化する離乳期での下顎頭に対する荷重ストレスの変化との関連についても、硬さの異なる食飼を与えた実験を行い、その結果を評価、検討した。

対象および方法

1. 実験動物

ddY マウス (日本 SLC, 浜松) を用い、通常の実験室条件下で飼料および水を自由に摂取させた。臍垢を確認した日を胎生 0 日とし、胎生 16 日、胎生 17 日を有する母マウスの頸椎を脱臼させた後に胎仔を子宮内から摘出した。生後発育段階では、生

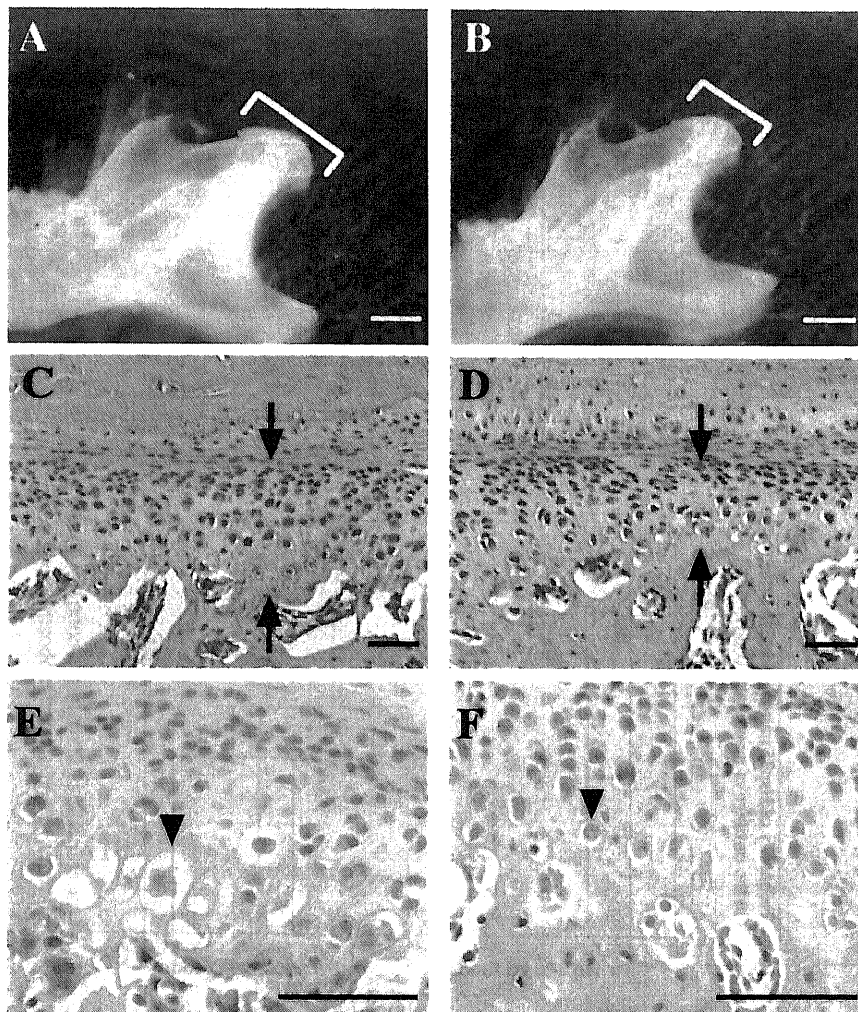


Fig. 4. Light micrographs showing the size of mandibular condyles (A, B) and H-E stained sagittal sections of the articular cartilage in mandibular condyles (C-F) from the mice fed with hard (A, C, E) or soft (B, D, F) foods from P3w for 8 weeks. Note that the size of mandibular condyle (squared bracket), the thickness of articular cartilage (arrows) and the size of hypertrophic chondrocytes (arrowheads) of the mice in hard-food group are larger than those of the mice in soft-food group. Scale bars indicate 1mm (A, B) \times 5. Scale bars indicate 50 μ m, (C, D) \times 10, (E, F) \times 40.

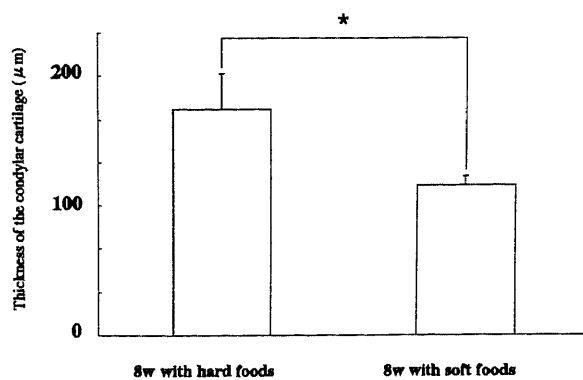


Fig. 5. Graph showing the thickness of the articular cartilage of mandibular condyles from the mice fed with hard or soft foods for 8 weeks. *Significant difference is presents between the two groups ($p < 0.05$, $n = 7$).

後0日, 1日, 1週, 1.5週, 2.5週, 3週, 4週, 6週, 8週齢以上(成獣)の雄マウスを用いた。腹腔内にペントバルビタール(大日本製薬, 大阪)を体重1Kgあたり50mg注射した後に開腹して右心房を切開し, 左心室より生理食塩水にて脱血し, 次に4%パラホルムアルデヒド/0.1Mリン酸緩衝液(pH7.2)にて灌流固定した後に下顎頭を付近の骨や軟組織とともに一魂として摘出した。固定は, 4%パラホルムアルデヒド/0.1Mリン酸緩衝液(pH7.2)で4~12時間, 4℃浸漬固定した。石灰化した試料は0.5M EDTA溶液(pH7.5)(和光純薬工業, 大阪)にて, 2~3週間脱灰した。すべての組織はパラフィンに包埋し, 4μmの厚さで薄切し, シランコーティングしたスライドガラス(Dako, Glostrup, Denmark)に載せた。

Ⅱ. 免疫組織化学

1. Hsp25

免疫組織化学染色にはウサギポリクローナル抗マウスHsp25抗体(Stress Gen, Victoria, Canada)を使用した。同抗体はウエスタンブロット法によりマウス組織に対して反応することがAmanoら⁹⁾により確かめられており, 他の多くの実験でこの抗

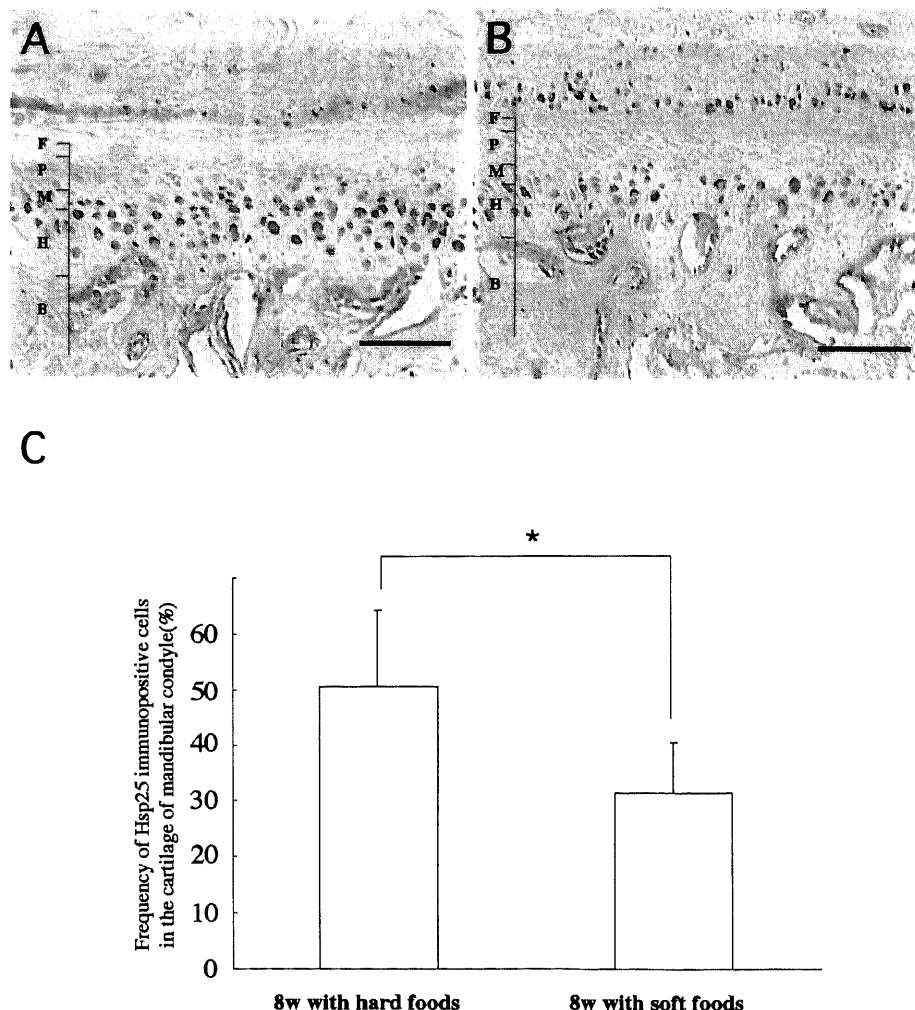


Fig. 6. Light micrographs (A, B) and graph (C) showing the localization and frequency of Hsp25-immunopositive chondrocytes in the articular cartilage of mice fed with hard (A) or soft (B) foods from P3w for 8 weeks. (A) Hsp25-immunopositive chondrocytes are localized in the zones of maturation and hypertrophy. (B) Hsp25-immunopositive chondrocytes are localized only in the zone of hypertrophy. F, fibrous layer; P, zone of proliferation; M, zone of maturation; H, zone of hypertrophy; B, bone layer. (C) The frequency of Hsp25-positive chondrocytes is significantly higher in mice of hard foods group than in soft foods group. * $p < 0.05$, $n = 5$. Scale bars indicate 50μm, (A, B) $\times 20$.

体の特異性が報告されている^{19)~21)}。免疫組織化学染色は切片を脱パラフィン後、0.3%過酸化水素水/メタノールに室温で10分浸漬し、内因性ペルオキシダーゼを失活させた。正常ブタ血清(20倍希釈)を室温で30分反応させた後に、ポリクローナル抗マウス Hsp25 抗体を PBS (pH7.4) にて 500 倍に希釈して一次抗体とし、室温で一晩反応させた。PBS にて洗浄後、ウサギ抗体に対する EnVision TM peroxidase 試薬 (Dako) を 1 時間作用させた後に 0.05% 過酸化水素水を含む 0.01% ジアミノベンチジン溶液 (pH7.6) を用いて可視化した。

2. PCNA

切片を脱パラフィンし、0.3% 過酸化水素水/メタノールに室温で 10 分浸漬し、内因性ペルオキシダーゼを失活させた後にモノクローナル抗マウス PCNA 抗体 (Dako) を 200 倍希釈して一次抗体として、室温で 30 分反応させた。PBS にて洗浄後、同種動物抗体による非特異的反応を除去するために Histomouse-SP Plus Kit for broad spectrum (ZYMED, South San Francisco, CA) を用いて検出した。

Ⅲ. 粉末食飼育または粉末食による飼育

離乳していない 3 週齢の雄マウス 51 匹を 2 つの実験群に分

け、通常の実験室条件下で飼料および水を自由に摂取させた。一つのグループでは餌は CMF (Oriental Yeast, 東京) を用い、固形飼料をそのまま用いた (固形食群, $n = 19$)。残りのグループでは固形飼料を乳棒と乳鉢にて粉碎し、粉状にしたものを粉末飼料として与えた (粉末食群, $n = 32$)。1 週間ないし 8 週間同じ飼料を与え続けて飼育した後に上述の方法にて固定を行った。一部の下顎頭はそのまま 10% 水酸化ナトリウムに 1 週間浸漬し、皮膚、筋組織等を取り除いた後に 100% グリセリンにて保存し、実体顕微鏡下にデジタルカメラ (DP-N, OLYMPUS) にて撮影を行った。残りの試料は、0.5M EDTA 溶液 (pH7.5) にて脱灰を行い、パラフィンに包埋して薄切切片を作成した。包埋、薄切に当たっては下顎頭の中心部が表面に対して垂直な面が得られるように特に意を用いた。作成した切片の一部は HE 染色を行い、軟骨の厚さを測定した。残りの切片について、Hsp25 および PCNA に対する免疫組織化学染色を行い、下顎頭軟骨上にある関節円板で一番薄い部位の下顎頭軟骨を選択して、下顎頭軟骨細胞中における免疫陽性細胞数を計測し免疫陽性細胞率を計算した。これらの結果は Student-t 検定 ($p < 0.05$) を用いて有意差の有無を解析した。

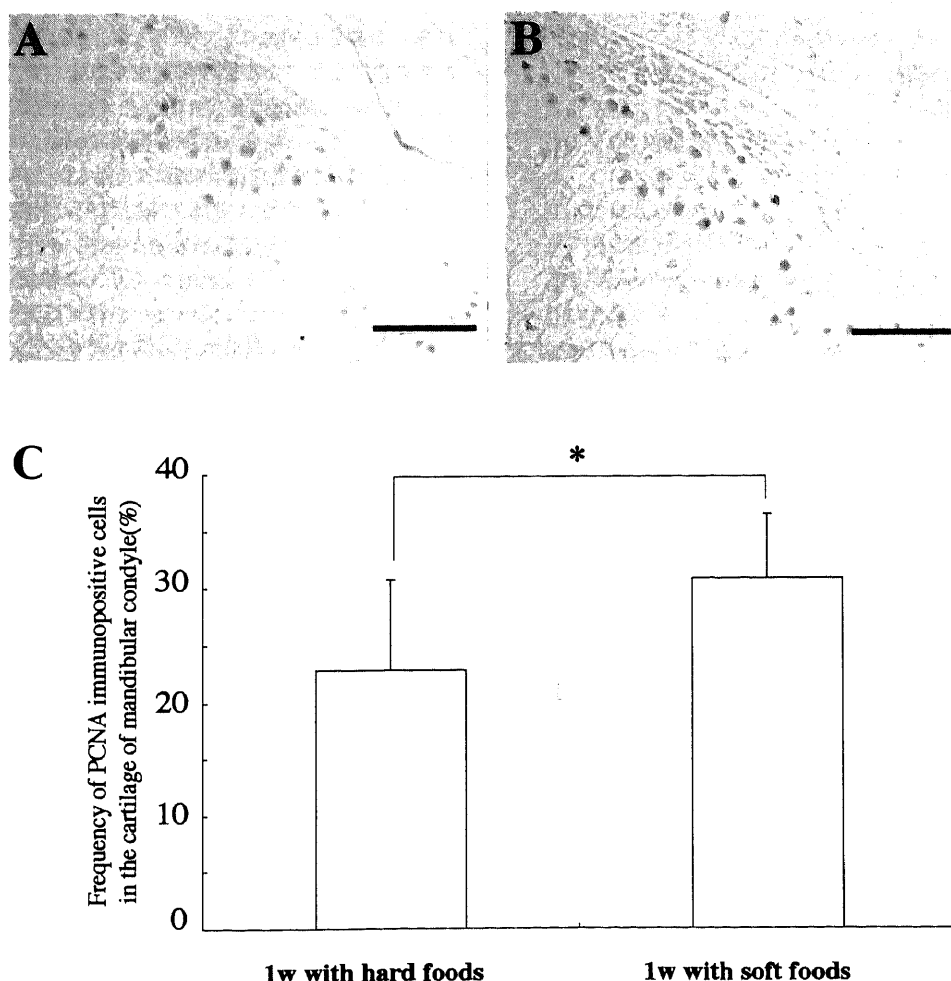


Fig. 7. Light micrographs (A, B) and graph (C) showing the localization and frequency of PCNA-immunopositive chondrocytes in the articular cartilage of mandibular condyles from the mice fed with hard (A) or soft (B) foods from P3w for 1 week. (C) The frequency of PCNA-positive chondrocytes is significantly higher in mice of soft-food group than in hard-food group. * $p < 0.05$, $n = 9$. Scale bars indicate 50 μm , (A, B) $\times 20$.

成 績

I. 胎生・生後発生段階でのHsp25およびPCNAの局在

下顎頭軟骨では、胎生16日に軟骨組織の発生が認められた。胎生17日では下顎頭軟骨中の肥大軟骨細胞の細胞質にHsp25免疫活性が認められた(図1A)。生後1日から関節腔、関節円板が形成されはじめ(図1B)、さらに生後1週齢には線維層、増殖層、成熟層、肥大軟骨層の4層が区別された。生後1週齢から生後2週齢ではHsp25免疫活性は肥大軟骨細胞層にのみ局在した(図1C)。生後3週齢から成獣にかけては、肥大軟骨層ばかりでなくその上部の成熟層に至る領域にHsp25免疫陽性軟骨細胞が局在した(図1D, E, F)。また成獣の膝関節の骨端板軟骨においては肥大軟骨層がHsp25免疫陽性を示した(図1G)。関節軟骨ではHsp25免疫活性を認めなかった(図1H)。

一方、PCNAに対する免疫反応は、胎生から生後3週齢までほとんどの増殖層及び成熟層の軟骨細胞の核に認められた(図2A, B)。生後4週齢から生後6週齢では増殖層のみにPCNA免疫陽性を認めた(図2C)。成獣ではPCNA陽性を示す軟骨細胞は著しく減少した(図を示さない)。以上のことから、PCNA陽性軟骨細胞はHsp25免疫陰性であり、それぞれ陽性細胞の分布する領域は一致せず相反する関係にあった。また成長が終了するに伴い軟骨細胞の増殖活性が低下すると、Hsp25陽性の軟骨細胞の局在の領域が広がった(表1)。

II. 粉末飼料による飼育

1. 飼育時の体重測定

固形食群、粉末食群ともに体重の変化に有意な差はなかった($p < 0.05$)(図3)。

2. 下顎頭の大きさと軟骨の厚さ

生後3週齢から8週間飼育した粉末食群では、同期間飼育した固形食群と比較して下顎頭の大きさが減少した(図4A, B)。またHE染色した切片において固形食群と比べて粉末食群では肥大軟骨細胞が小さく、下顎頭軟骨は有意に薄かった($p < 0.05$)(図4C, D, 図5)。

3. Hsp25およびPCNAの発現と局在

生後3週齢から8週間飼育した粉末食群の下顎頭軟骨においては、Hsp25免疫活性は肥大軟骨層の軟骨細胞にのみ局在し、固形食群と比較して有意に免疫陽性細胞率が低かった($p < 0.05$)(図6)。PCNA免疫活性については、生後3週齢から1週間飼育した粉末食群の下顎頭軟骨において、増殖層と一部の成熟層の軟骨細胞に陽性であり、固形食群と比較して有意にPCNA免疫陽性細胞率が高かった($p < 0.05$)(図7)。

考 察

1. 下顎頭軟骨の発生・成長と荷重ストレスについて

本研究から、下顎頭軟骨においてHsp25は発生から成獣に至るまで基本的に肥大軟骨細胞に局在し、3週齢以降、成熟層の軟骨細胞もHsp25を発現することが分かった。これはマウス顎関節において3週齢を境にして成長ないし荷重ストレスに変化が起ることを示唆している。マウスではこの時期に主に母乳から通常の固形食へと食性が変化することから、固形食の摂取開始に伴って顎関節にかかる荷重ストレスは増加すると思われる。軟骨細胞の増殖を示すPCNAの発現が出生後から3週齢までは比較的高いに対し、6週齢では著しく低下する(図2)ことから、固形食の摂取開始の準備として生体内ではそれに対応

できるように顎関節の成長が生後から3週齢にかけて急速に進行すると考えられる。3週齢以降はそれ以前に比べて関節の成長が遅くなることから²²⁾、組織内では何らかの機構により軟骨細胞の増殖を抑制する必要があると思われる。本研究でHsp25陽性細胞とPCNA陽性細胞が相反し、3週を境にして前者の数が増加して後者の数が減少する結果は、荷重ストレスによって発現するHsp25が軟骨細胞の増殖抑制と関連していることを示唆した。

長管骨が骨端板軟骨での軟骨内骨化による骨組織の新生によりその長さを成長させるのに対し、下顎骨では下顎骨体部の成長は胎生期における発生から生後の発育に至るまで一貫して膜性骨化により行われるが、下顎頭はその表面の関節軟骨自身が軟骨内骨化をすることによって成長する。従って、下顎頭軟骨においては長管骨における関節軟骨と骨端板軟骨の両方の役割を持っていると考えられる¹¹²⁾。下顎頭軟骨は長管骨と同様に軟骨細胞が急速に増殖、成熟、細胞外基質を大量に生産しつつ肥大化する。その後基質に石灰化が生じて軟骨細胞が死滅し、軟骨小腔が残ってそこに血管が侵入して骨芽細胞を運び込み、骨芽細胞が骨組織を産生して骨に置き換えていく。下顎は胎生期の第一鰓弓の下顎突起に由来する。そこでは鰓弓骨格としてメッケル軟骨がまず形成されるが、メッケル軟骨は骨化せずにその外側から膜性骨化により下顎骨が形成される¹⁾。つまり下顎体は頭蓋骨と同様に早い段階で直接、開業から骨が作られ、出生の段階までにある程度が形成されている必要があるのに対して、下顎頭は別組織としてようやく胎生後期に軟骨が発生し、生後になってから咬合と咀嚼が機能を開始するまでに骨化を完成して、その後の摂食環境に適応できるようになると思われる。本研究においてマウスでは下顎骨体部の骨組織が胎生14日に生じるのに対し²³⁾、下顎頭軟骨は胎生16日ごろに発生することからも上記のことが支持される。この結果はShibataら²⁴⁾やFukudaら²⁵⁾の報告とほぼ一致しており、軟骨原基の発生の後に肥大軟骨細胞が出現してくる結果とも一致していた。

下顎体と下顎頭軟骨が癒合して²⁶⁾、顎関節としての機能を果たすようになるまではメッケル軟骨がいわゆる一次関節として働いており、顎関節は二次関節とも言われる¹¹²⁷⁾。メッケル軟骨は出生時に骨化することなく前方のほとんどが変性消失し、中間部は蝶形下顎靭帯などになり、後方部は骨化して耳小骨のツチ骨、キヌタ骨になる²⁸⁾。一次関節は顎関節が機能するまでの仮の役割を果たしていると考えられている²⁷⁾。そして顎関節が最初に機能するのは出生後の哺乳においてであるが、哺乳は出生後すぐに始まり、その時点で顎関節には関節円板や関節腔が形成されている。しかし哺乳では顎関節に大きな荷重ストレスはかからず、顎運動もほとんど必要ない。その後、軟骨層が発達して組織構築がはつきりしてくると離乳して硬い飼料を噛み砕くようになり、下顎頭に対する荷重ストレスに耐え得るようになる。成長期における下顎頭に対する荷重ストレスによって下顎頭の成長が促進されるという説²⁹⁾に基づき、逆に粉末飼育や臼歯の抜歯によって荷重ストレスを少なくすると、成長が促進されずに下顎頭軟骨が非薄化する。例えば、Endoら³⁰⁾は成長期のラットにおいて臼歯の抜歯や軟食飼育により、下顎頭の大きさが通常のものと比べて小さくなり、下顎頭軟骨における増殖層でのフィブロネクチンの発現が減少し、肥大軟骨層の厚さが小さくなったと報告している。Sasaguriら³¹⁾は骨基質形成のマーカーである骨シアル蛋白(bone sialoprotein, BSP)を

用いて、成長期のマウスに軟らかい食飼を与えた飼育（軟食飼育）を行ったところ、下顎頭の成長が抑制され、BSPの発現が減少したと報告している。さらに Killaridis ら³²⁾ は成長期のラットで軟食飼育を行ったところ、下顎頭が小さくなり、下顎頭軟骨は前方部が薄く、後方部が厚くなったと報告している。本研究において得られた粉末食群の結果でも下顎頭の成長鈍化と軟骨の非薄化が認められたことから、下顎頭軟骨では適度な荷重ストレスが働くことによって軟骨内骨化が促進されるのではないかと考えられた。成長期のウサギの下顎頭の位置を後方に変化させると、下顎頭軟骨に対する咬合力の加わる位置が変化し、その結果下顎頭軟骨の分化と下顎頭軟骨の成長が促進されること³³⁾ や、増殖期の軟骨細胞を3Dコラーゲン材料上で伸展培養したところ、成熟軟骨細胞のマーカーであるCMP/matrilin-1 (Cartilage matrix protein) や肥大軟骨細胞に発現するX型コラーゲンの遺伝子発現が増加する³⁴⁾ などのデータから、下顎頭軟骨では荷重ストレスに反応して軟骨細胞が増殖期から分化期へスイッチすると考えられる。本研究の生後発生におけるHsp25の局在の変化の結果と考え合わせると、この荷重ストレスの増加による軟骨細胞の増殖から分化への移行促進にHsp25が深く関わっていることが示唆された。

2. Hsp25と粉末食飼育

離乳期に咀嚼を開始すると、3週を境として下顎頭軟骨に対する荷重ストレスが増加すると同時にHsp25の発現が肥大軟骨層から成熟層にまで広がることが認められた。この発現局在のパターンは同じ成長期軟骨である膝関節の骨端板の軟骨内骨化における肥大層のみでのHsp25の局在パターンとは異なる結果であった。下顎頭軟骨にかかる咀嚼による荷重ストレスを抑制するために粉末飼料を与えて飼育を行ったところ、飼育1週間後には粉末食群において軟骨細胞増殖活性が上昇し、また飼育8週間後には下顎頭の大きさと軟骨の厚さが小さくなり、Hsp25の発現が肥大軟骨層のみに局限して認められ、その陽性細胞率も減少した。この結果は、下顎頭軟骨におけるHsp25の発現が減少することによって増殖から分化への移行が十分に進まず増殖活性が高いままになり、その結果、分化した成熟および肥大軟骨細胞が減少したことを表わすと考えられる。また肥大軟骨層ではアルカリフォスファターゼの活性が認められ、その部位は石灰化の準備をする部位と一致することが言われている³⁵⁾。従って肥大軟骨細胞が減少することによって石灰化が行われず、その結果として下顎頭軟骨の厚さが薄くなって軟骨内骨化が抑制されたことが原因となり下顎頭の大きさが小さくなったと推測される。しかしPCNAの発現が飼育後1週間後の時点では粉末食群と固形食群との間に有意差を認めたにも関わらず、8週間後にはほとんど差を認めなくなったのは、成獣になって成長が停止し、軟骨細胞の増殖活性が落ちてきたためと考えられる。実際に固形食群と粉末食群のどちらも成獣では増殖活性の著しい低下が認められた。以上のことから、Hsp25は下顎頭軟骨においては増殖期から分化期への移行の調整因子としての役割を果たしており、下顎頭軟骨の成長の調節を行っていると考えられる。

3. 軟骨の増殖、分化

軟骨の増殖、分化に関わる因子として上皮細胞増殖因子 (epidermal growth factor, EGF)、インドハリネズミ (Indian hedgehog, Ihh)、副甲状腺ホルモン関連蛋白 (parathyroid hormone-related protein, PTHrP)、骨誘導因子 (bone-matrix

protein, BMP)、線維芽細胞増殖因子 (fibroblast growth factor, FGF)、Sox familyなどが報告されている。EGFは下顎頭軟骨において軟骨基質や軟骨細胞の産生に関与し、軟骨の厚さを調節していると報告されている³⁶⁾。IhhとPTHrPはお互いにフィードバックを行っており、Ihhは前肥大軟骨層に発現して肥大軟骨細胞の分化を調節し、PTHrPは増殖層の軟骨の分化を遅くする作用があると報告されている³⁷⁾。Minina ら³⁸⁾ が胎生期ニワトリ前肢 (Forelimbs) の器官培養にてBMP、IhhやPTHrPなどの関係を明らかにし、BMPが軟骨の分化する速度を調節していることを報告している。FGFのなかでもOhbayashi ら³⁹⁾ はFGF18が胎生期の骨端板軟骨形成において軟骨細胞の増殖を抑制する役割があるのではないかと考察している。Sox familyのなかにはSox9、Sox6、L-Sox5などが軟骨の間葉細胞から軟骨層の分化に関与しているとされている⁴⁰⁾。下顎頭軟骨と骨端板軟骨ではI型PTH/PTHrPの発現パターンが異なっており、両者で増殖・分化の調節機構が違う可能性も指摘されている⁴¹⁾。しかし本研究からも明らかなように、Hsp25は基本的には下顎頭軟骨と骨端板軟骨で共通して肥大軟骨細胞に局在している。このことから、Hsp25が上記の増殖・分化因子のいずれかと関連してそのシグナル伝達に介在することにより、軟骨細胞に特異的な増殖・分化の調節因子として働いている可能性が示唆される。

4. アグリカンやエストロゲンとの関係

軟骨に特異的なHsp25の機能として報告されているものに、軟骨基質成分の一つであるアグリカンに対する作用がある。アグリカンは細胞外基質の主体を占めるプロテオグリカンの一つで、コア蛋白に多数の糖鎖が結合した構造を持っており⁴²⁾、Hsp25はアグリカンの細胞内の合成に際し、G3ドメインに働き、分子シャペロンとして働くとされている¹⁷⁾。しかし下顎頭を含め、ほとんどの全層の軟骨では基質にほぼ均一にアグリカンが分布していることから、Hsp25の肥大軟骨細胞への限局的な局在との関係が見いだせない。また軟骨基質は一般に静止期や増殖期の軟骨細胞から盛んに分泌されていることを考えると、現在のところアグリカンとHsp25が局在している肥大軟骨細胞との関係は不明である。またHsp25は元来乳癌細胞から単離されたエストロゲンに応答する蛋白質である⁴³⁾⁴⁴⁾。エストロゲンと下顎頭の関係では雌ラットの下顎頭をエストロゲンの濃度別に器官培養し、エストロゲンレセプターに結合させたところ、エストロゲン濃度の高い下顎頭では肥大軟骨細胞が減少し、下顎頭軟骨の厚さが薄くなった⁴⁵⁾。この結果は、下顎頭軟骨にはエストロゲンレセプターが存在し、エストロゲンが軟骨の細胞外基質を減少させ、軟骨の厚さを調整していることを示している。このことは顎関節症や骨粗鬆症などの疾患に女性が多い一因と考えられているが、本研究では雄を用いているのでエストロゲンの影響はほとんど無視し得ると思われる。しかし、エストロゲン投与による下顎頭軟骨に対する効果は本研究による粉末食飼育の結果とよく似ている。エストロゲンの効果とHsp25発現との関係は今後の研究課題である。

結 論

1. マウス下顎頭軟骨は胎生16日から分化し始め、生後0日には関節円板や関節腔が出現し、生後1週齢で軟骨層が明瞭になった。
2. 胎生17日から成獣に至る下顎頭軟骨にHsp25が局在した。

生後3週齢までは肥大軟骨細胞に限局して局在していたが、生後3週齢以降には成熟層と肥大軟骨層の軟骨細胞に局在し、局在パターンの変化が認められた。

3. PCNA陽性の増殖軟骨細胞は、胎生期から生後3週齢までは増殖層と成熟層に分布していたが、生後3週齢以降には増殖層のみに分布するようになり成獣ではその数も著しく減少した。すなわちHsp25陽性細胞とPCNA陽性細胞は相反した。

4. マウスを生後3週から8週間にわたり粉末食飼育したところ、下顎頭軟骨が有意に菲薄化し、肥大軟骨細胞が小さくなった。

5. 固形食飼育では、Hsp25免疫活性は成熟層及び肥大軟骨層の軟骨細胞に認められたが、8週間の粉末食飼育ではHsp25免疫活性は肥大軟骨細胞のみに認められた。Hsp25陽性細胞率は粉末食飼育で固形食飼育より有意に低かった。

6. 固形食飼育では、PCNA陽性軟骨細胞は増殖層にのみ認められたが、1週間の粉末食飼育では増殖層及び成熟層に認められた。PCNA陽性細胞率は粉末食飼育で固形食飼育より有意に高かった。

7. 以上の結果から、下顎頭軟骨の生後発生において、Hsp25は離乳期以降の食性の変化に伴う荷重ストレスに対応して発現し、軟骨細胞の増殖から分化への移行を促進することにより下顎頭の成長を調節していることが示唆された。

本研究の一部は、第14回日本顎関節学会総会(2001年、神戸)、第108回日本解剖学会総会(2002年、浜松)、第56回日本口腔科学学会総会(2002年、大阪)に於いて発表した。

謝 辞

稿を終えるに臨み、終始御指導と御検閲を賜りました恩師金沢大学大学院医学系研究科がん医科学専攻がん細胞学講座細胞浸潤学分野山本悦秀教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究を直接御指導、御教示頂きました明海大学歯学部口腔解剖学第二講座天野修教授、金沢大学大学院医学系研究科がん医科学専攻がん細胞学講座組織発達構築学分野井関尚一教授に心から謝意を表します。また、御助言、御協力を戴きました金沢大学大学院医学系研究科がん医科学専攻がん細胞学講座細胞浸潤学分野中川清昌助教授、高塚茂行講師、上本耕一郎博士、高桜大輔博士、丸川浩平院生、金沢大学大学院医学系研究科がん医科学専攻がん細胞学講座組織発達構築学分野若山友彦助教授、山本美由紀助手、山崎秀一技官、赤堀康子事務員に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Ten Cate AR. Oral Histology. Development, Structure and Function, 5th ed, p386-407, Mosby-Year Books, St.Louis, 1998
- 2) Sarnat BG, Laskin DM. The temporomandibular joint. A biological basis for clinical practice, 4th ed, p3-236, W.B.Saunders Company, Philadelphia, 1992
- 3) Nozawa-Inoue K, Ohshima H, Kawano Y, Yamamoto H, Takagi R, Maeda T. Immunocytochemical demonstration of heat shock protein 25 in the rat temporomandibular joint. Arch Histol Cytol 62: 483-491, 1999
- 4) Lindquist S, Craig EA. The heat-shock proteins. Annu Rev Genet 22: 631-677, 1988
- 5) Latchman DS. Stress proteins, 136, p101-132, Springer, Berlin, 1999
- 6) Ciocca DR, Oesterreich S, Chamness GC, McGuire WL, Fuqua SAW. Biological and Clinical Implications of Heat Shock Protein 27000 (hsp27): a review. J Nat Cancer Inst 95: 1558-1570,

1993

- 7) Robyn AL, Carver JA, Ehrnsperger M, Buchner J, Esposito G, Behlke J, Lutsch G, Kotlyarov A, Gaestel M. Mouse hsp25, a small heat shock protein. The role of its C-terminal extension in oligomerization and chaperone action. Eur J Biochem 267: 1923-1932, 2000
- 8) Gernold M, Knauf U, Gaestel M, Stahl J, Kloetzel PM. Development and tissue-specific distribution of mouse small heat shock protein hsp25. Dev Genet 14: 103-111, 1993
- 9) Amano O, Kudo Y, Shimada M, Wakayama T, Yamamoto M, Iseki S. Transient occurrence of 27kda heat shock protein in the terminal tubule cells during postnatal development of the rat submandibular gland. Anat Rec 264: 358-366, 2001
- 10) Abdelwahid E, Eriksson M, Pelliniemi LJ, Jokinen E. Heat shock proteins, HSP25 and HSP70, and apoptosis in developing endocardial cushion of the mouse heart. Histochem Cell Biol 115: 95-104, 2001
- 11) Hanah SM, Strahler JR, Chan Y, Kuick R, Teichroew D, Neel JV, Hailat N, Keim DR, Gratio-Deans J, Unger D, Melhem R, Zhu XX, Andrews P, Lottspeich F, Eckerskorn C, Chu E, Alii, Fox DA, Richardson BC, Turka LA. Data base analysis of protein expression patterns during T-cell ontogeny and activation. Proc Natl Acad Sci USA 90: 3314-3318, 1993
- 12) Shakoori AR, Oberdorf AM, Owen TA, Weber LA, Hickey E, Stein JL, Lian JB, Stein GS. Expression of heat shock protein genes during differentiation of mammalian osteoblasts and promyelocytic leukemia cells. J Cell Biol 48: 277-287, 1992
- 13) Benndorf R, Kraft R, Otto A, Stahl J, Bohm H, Bielka H. Purification of the growth-related protein P25 of the Ehrlich ascites tumor and analysis of its isoforms. Biochem Int 17: 225-234, 1988
- 14) Wieske M, Benndorf R, Behlke J, Dolling R, Grelle G, Bielka H, and Lutsch G. Defined sequence segments of the small heat shock proteins HSP25 and alphaB-crystallin inhibit actin polymerization. Eur J Biochem 268: 2083-2090, 2001
- 15) Stahl J, Wobus AM, Ihrig S, Lutsch G, Bielka H. The small heat shock protein hsp25 is accumulated in P19 embryonal carcinoma cells and embryonic stem cells of line BLC6 during differentiation. Differentiation 51: 33-37, 1992
- 16) Mehlen P, Mehlen A, Godet J, Arrigo A-P. Hsp27 as a switch between differentiation and apoptosis in murine embryonic stem cells. J Biol Chem 272: 31657-31665, 1997
- 17) Tiffée JC, Griffin JP, Cooper LF. Immunolocalization of stress proteins and extracellular matrix proteins in the rat tibia. Tissue Cell 32: 141-147, 2000
- 18) Vanmuylder N, Evrard L, Dourov N. Strong expression of heat shock proteins in growth plate cartilage, an immunohistochemical study of HSP28, HSP70, and HSP110. Anat Embryol 195: 359-362, 1997
- 19) Yamamoto M, Fan L, Wakayama T, Amano O, Iseki S. Constitutive expression of the 27-kDa heat-shock protein in neurons and satellite cells in the peripheral nervous system of the rat. Anat Rec 262: 213-220, 2001
- 20) Ohshima H, Ajima H, Kawano Y, Nozawa-Inoue K,

- Wakisaka S, Maeda T. Transient expression of heat shock protein (Hsp) 25 in the dental pulp and enamel organ during odontogenesis in the rat incisor. *Arch Histol Cytol* 63: 381-395, 2000
- 21) Plumier JC, Hopkins DA, Robertson HA, Currie RW. Constitutive expression of the 27-kDa heat shock protein(Hsp27) in sensory and motor neurons of the rat nervous system. *J Comp Neurol* 384: 409-428, 1997
- 22) 飯塚哲夫, 瀬端正之, 岩澤忠正, 本橋康助. 歯科矯正学, 第3版, 医歯薬 23-45頁, 東京, 1994
- 23) Frommer J, Margolies MR. Contribution of Meckel's cartilage to ossification of the mandible in mice. *J Den Res* 50:1260-1267, 1971
- 24) Shibata S, Fukada K, Suzuki S, Yamashita Y. Immunohistochemistry of collagen types II and X, and enzyme-histochemistry of alkaline phosphatase in developing condylar cartilage of the fetal mouse mandible. *J Anat* 191: 561-570, 1997
- 25) Fukuda K, Shibata S, Suzuki S, Ohya K. In situ hybridisation study of type I, II, X collagens and aggrecan mRNAs in the developing condylar cartilage of fetal mouse mandible. *J Anat* 195: 321-329, 1999
- 26) 後藤仁敏訳. 頭蓋顔面の発生学 第13章 顎関節, 書林, 152-155頁, 東京, 1976
- 27) Okumura K, Iwai-Lio Y. Developmental Anatomy of the mouse Stapediovestibular and Tempromandibular joints. *Okajimas Folia Anat Jpn* 69: 385-400, 1993
- 28) Zschitz A, Weiser H, Stofft E, Krahn V, Gabius HJ, Khaw A, Biesalski HK. Characterization of glycoconjugate expression during development of Meckel's cartilage in the rat. *Anat Embryol* 191: 47-59, 1995
- 29) Boyd RL, Gibbs CN, Mahan PE, Richmond AF, Laskon JL. Tempromandibular joint force measured at the condyle of *Macaca arctoides*. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 97: 472-479, 1990
- 30) Endo Y, Mizutani H, Yasue K, Senga K, Ueda M. Influence of food consistency and dental extractions on the rat mandibular condyle: a morphological, histological and immunohistochemical study. *J Craniomaxillofac Surg* 26: 185-190, 1998
- 31) Sasaguri K, Jiang H, Chen J. The effect of altered functional forces on the expression of bone-matrix proteins in developing mouse mandibular condyle. *Arch Oral Biol* 43: 83-92, 1998
- 32) Killaridis S, Thilander B, Kjellberg H, Topouzelis N, Zafiriadis A. Effect of low masticatory function on condylar growth: a morphometric study in the rat. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 116: 121-125, 1999
- 33) Salo L, Kantomaa T. Type II collagen expression in the mandibular condyle during growth adaptation: an experimental study in the rabbit. *Calcif Tissue Int* 52: 465-469, 1993
- 34) Wu QQ, Chen Q. Mechanoregulation of chondrocyte proliferation, maturation, and hypertrophy: ion-channel dependent transduction of matrix deformation signals. *Exp Cell Res* 256: 383-391, 2000
- 35) Roach HI. Association of matrix acid and alkaline phosphatases with mineralization of cartilage and endochondral bone. *Histochem J* 31: 53-61, 1999
- 36) Tsubai T, Hayashi Y, Scott JE. The effect of epidermal growth factor on the fetal rabbit mandibular condyle and isolated condylar fibroblasts. *Arch Oral Biol* 45: 507-515, 2000
- 37) Vortkamp A, Lee K, Lanske B, Segre GV, Kronenberg HM, Tabin CJ. Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science* 273: 613-622, 1996
- 38) Minina E, Wenzel HM, Kreschel C, Karp S, Gaffield W, McMahon AP, Vortkamp A. BMP and Ihh/PTHrP signaling interact to coordinate chondrocyte proliferation and differentiation. *Development* 128: 4523-4534, 2001
- 39) Ohbayashi N, Shibayama M, Kurotaki Y, Imanishi M, Fujimori T, Itoh N, Takada S. Fgf18 is required for normal cell proliferation and differentiation during osteogenesis and chondrogenesis. *Genes Dev* 16: 870-879, 2002
- 40) Crombrughe BD, Lefebvre V, Nakashima K. Regulatory mechanisms in the pathways of cartilage and bone formation. *Cell Biol* 13: 721-727, 2001
- 41) Suda N, Shibata S, Yamazaki K, Kuroda T, Senior PV, Beck F, Hammond VE. Parathyroid hormone-related protein regulates proliferation of condylar hypertrophic chondrocytes. *J Bone Miner Res* 14: 1838-1847, 1999
- 42) Kiani C, Chen L, Wu YJ, Yee AJ, Yang BB. Review. Structure and function of aggrecan. *Cell Res* 12: 19-32, 2002
- 43) Ciocca DR, Adams DJ, Edwards DP, Bjercke RJ, McGuire WL. Distribution of an estrogen-induced protein with a molecular weight of 24000 in normal and malignant human tissues and cells. *Cancer Res* 43: 1204-1210, 1983
- 44) Edwards DP, Adams DJ, and McGuire WL. Induction of the estrogen-regulated "24K" protein by heat shock. *Cancer Res* 49: 4126-4129, 1981
- 45) Ng MC, Harper RP, Le CH, Wong BS. Effects of estrogen on the condylar cartilage of the rat mandible in organ culture. *J Oral Maxillofac Surg* 57: 818-823, 1999

Roles and localization of 25kDa Heat shock proteins in the development and growth of mandibular condyles in mice Mayumi Shimada, Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — J. Juzen Med Soc., 111, 256 — 266 (2002)

Key words Hsp25, mandibular condyle, development and growth, hypertrophic chondrocyte, soft foods

Abstract

Mandibular condyles develop from the cartilaginous rudiment and later fuse with the main part of mandibular bone formed by membranous ossification. Underdevelopment of the mandibular condyles causes pathological changes in both the morphology and function of the temporomandibular joint. In the present study, to shed light on the molecular mechanisms regulating the growth of condylar cartilage, the expression and localization of 25kDa heat shock protein (Hsp25) were immunohistochemically examined in the developing condylar cartilage of mice. At embryonic day 17, Hsp25 first appeared in the hypertrophic chondrocytes undergoing endochondral ossification in the cartilaginous rudiments of the mandibular condyles. After birth, Hsp25 was exclusively and intensely localized in the chondrocytes of the hypertrophic zone until 3 weeks of age. In contrast, proliferating cell nuclear antigen (PCNA)-positive chondrocytes were located in the zones of proliferation and maturation. After 3 postnatal weeks, Hsp25-positive chondrocytes extended to the maturation zone as well as the hypertrophic zone, whereas PCNA-positive chondrocytes turned to be confined to the hypertrophic zone. Thus, the expression of Hsp25 and cell proliferation proved to be contradictory phenomena in the developing chondrocytes. To examine the effect on the development of condylar cartilage of changes in the mechanical stresses experienced by mandibular condyles after weaning, 3-week old mice were fed on powdered soft food for 8 weeks. In the mice fed on powdered food, the size of mandibular condyles was smaller than in the control mice fed on normal hard food. Moreover, the articular cartilage was thinner, PCNA-positive chondrocytes were larger in number and distributed in the zones of both maturation and hypertrophy, while Hsp25-positive chondrocytes were smaller in number and restricted to the zone of hypertrophy, as compared to the control. These results suggest that Hsp25, induced by the mechanical stresses due to the food after weaning, plays an important role in the development of mandibular condyles from proliferation to differentiation.